

Estudo da utilização de terpeno como antifúngico alimentar em substituição aos conservantes químicos sintéticos

César Augusto Costa de Medeiros ¹
Bruna Barbosa Maia da Silva ²
Karine Barbosa Maia da Silva ³

RESUMO

Fungos compreendem um grupo heterogêneo formado por leveduras, fungos filamentosos e cogumelos, amplamente distribuídos na natureza e que podem acarretar diversas doenças alimentares quando entram na cadeia alimentar. Diante das possíveis infecções que os fungos podem causar em alimentos, a utilização de conservantes químicos começou a tornar-se viável na conservação destes alimentos, porém, devido suas propriedades teratogênicas e carcinogênicas, começou a ser mal visto, e foi então que os pesquisadores mudaram o rumo das pesquisas para o desenvolvimento de alternativas naturais que viessem a proteger o alimento destes microrganismos, sem causar danos à saúde do consumidor, e foi então que óleos essenciais e seus componentes têm sido amplamente utilizados para o estudos da atividade antifúngica *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de terpenos, a exemplo do α -(-)-*bisabolol*, como conservante alimentar, natural, em substituição aos conservantes químicos sintéticos. A pesquisa foi realizada a partir da técnica de Concentração Inibitória Mínima, onde cepas de *Fusarium oxysporium* foram previamente tratadas e incubadas até o momento do ensaio. α -(-)-*bisabolol*, em diferentes concentrações, foi colocado em contato com as células fungicas, para que se pudesse avaliar seu potencial inibitório frente ao crescimento do mesmo. Como resultado da pesquisa, obtivemos que α -(-)-*bisabolol* apresenta potencial protetor contra *F. oxysporum*, visto que em concentrações que variam de 128 $\mu\text{g/mL}$ a 1024 $\mu\text{g/mL}$ foram suficientes para inibir 100% do crescimento fúngico. Desta forma concluímos que produtos naturais como terpenos, a exemplo de α -(-)-*bisabolol*, apresenta potencial protetor alimentar em substituição a conservantes químicos sintéticos.

Palavras-chave: Fungos, Infecções alimentares, Conservantes químicos, Terpenos, Produtos naturais.

¹ Graduando do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, cesaracmcosta@gmail.com;

² Graduado pelo Curso de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, brunambsilva1@gmail.com;

³ Graduando do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, karinebmaia@gmail.com;

INTRODUÇÃO

A contaminação e a deterioração de alimentos por microrganismos acarreta a grandes problemas relacionados a perdas de produção e a Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Dentre um dos principais causadores de contaminação de vários *commodities* agrícolas antes da colheita ou até mesmo em condições pós-colheita, destacam-se os fungos. (ABBASZADEH et al., 2014; MACWAN et al., 2016; VILLEGAS-RASCON et al., 2017).

Os fungos compreendem um grupo heterogêneo formado de leveduras, fungos filamentosos e cogumelos, que atuam como sapróbrios e parasitas. São seres estudados como causadores de doenças em humanos, animais e plantas, onde além de causarem fortes impactos econômicos e apresentar alta variabilidade populacional e genética, os fungos fitopatogênicos afligem a segurança alimentar, uma vez que suas micotoxinas entram na cadeia alimentar (OLIVEIRA, et al, 2011; ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012; JIMTHA et al., 2016).

Dentre os principais gêneros fúngicos, *Fusarium*, de filamentos hialinos e septados, apresenta-se como um dos maiores grupos responsáveis por esta contaminação em alimentos. (DOMENICO et al., 2015; ESCRIVÁ, FONT e MANYES, 2015). *Fusarium oxysporum* é a espécie mais amplamente distribuída do gênero, sua patogenicidade se deve a capacidade de produção uma variedade de micotoxinas, sendo principalmente a fumonisinas, zearalenona e tricotecenos, representando desde efeitos tóxicos agudos e crônicos, ou até propriedades carcinogênicas (GRENIER E APPLGATE, 2013; GORDON et al., 2015).

Alguns alimentos, devido suas excelentes fontes nutricionais, são facilmente colonizados por estes microrganismos. Desta forma a utilização de conservantes alimentares passou a ser necessária para que se evitasse algumas contaminações alimentares. Com o objetivo de reduzir as perdas, o uso de fungicidas químicos durante a produção de alimentos tornou-se uma alternativa viável, porém tanto a questão econômica como segurança alimentar e ambiental têm desestimulado a utilização desses compostos, visto que estes podem ser associados também a problemas teratogênicos, carcinogênicos e tóxicos quando aplicados em matriz alimentar (ABBASZADEH et al., 2014).

Assim, tendo em vista estes problemas causados pelos produtos químicos, os produtos naturais são importantes instrumentos no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas, onde as plantas se colocam como fontes importantes de moléculas biologicamente ativas que

podem ser utilizadas na obtenção de novos fármacos como alternativa de controle desses agentes fitopatogênicos, pragas agrícolas e plantas infestantes. Foi aí que muitos pesquisadores mudaram o rumo das pesquisas e passaram a desenvolver alternativas naturais que viessem a causar o mesmo efeito protetor nas matrizes alimentares sem causar prejuízos a saúde dos consumidores. (BRAZ FILHO, 2010; OOTANI et al., 2013).

Os óleos essenciais, considerados complexos de compostos voláteis caracterizados pelo odor forte, são formados pelo metabolismo secundário das plantas, encontrados em suas folhas, resinas, frutos, flores, tronco, têm sido amplamente utilizados para o estudos da atividade antifúngica *in vitro* (CHERRAT et al., 2014; MACWAN et al., 2016).

Dentre os óleos essenciais e seus componentes, destacam-se os terpenos, classificados como compostos hidrogenados de cadeias carbônicas cíclicas ou alifáticas, largamente distribuídos na natureza, presentes em óleos essenciais de uma ampla variedade de plantas aromáticas, que abrangem uma grande variedade de substâncias formadas pela união de unidades pentacarbonadas chamada isopreno, sendo agrupadas em: hemiterpenos (C₅), monoterpenos (duas unidades de isopreno, C₁₀), sesquiterpenos (três unidades de isopreno, C₁₅), diterpenos (quatro unidades de isopreno, C₂₀), triterpenos (seis unidades de isopreno, C₃₀) e carotenoides (SANTOS, 2015).

Na classe dos terpenos destaca-se o α -(-)-*bisabolol* que se caracteriza por ser um álcool sesquiterpeno monocíclico, com a fórmula química C₁₅ H₂₆ O. Foi primeiramente isolado em 1951 por Isaac e colaboradores das flores de *Matricaria chamomilla*. As atividades biológicas mais importantes de α -(-)-*bisabolol* são anti-inflamatórios, anti-irritantes, antibacterianos propriedades termiais e não alergênicas (KAMATOU, 2010).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de terpenos, a exemplo do α -(-)-*bisabolol*, como conservante alimentar, natural, em substituição aos conservantes químicos sintéticos.

METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e no Laboratório de Microbiologia, ambos da UAS/CES/UFCG. As respectivas soluções do α -(-)-*bisabolol* foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em 100 μ L dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e utilizando água destilada esterilizada em quantidade suficiente para obter a concentração inicial de 1024 μ g/mL. A partir desta concentração,

foram feitas diluições seriadas em razão de dois até alcançar concentrações inferiores utilizando o próprio meio RPMI 1640.

Para realização do teste de atividade antifúngica, foram utilizadas cepas de *F. oxysporum* (FO 73, 105, 132, 134, 136 e 141). Todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose inclinado sob refrigeração (8°C), no Laboratório de Bioquímica até o momento dos testes.

As cepas fúngicas foram cultivadas em ágar batata dextrose a 28°C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com de solução salina estéril (NaCl 0,9 %), e as suspensões feitas por suaves agitações com auxílio de uma pipeta de transferência. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para tubos de ensaio esterilizados. Após agitação de 15 segundos, cada suspensão foi deixada em repouso por 3-5 minutos e o sobrenadante foi recolhido em tubos de ensaio estéreis. As densidades das suspensões de cada cepa foram ajustadas em espectrofotômetro a 530 nm para um valor de 68-70% de transmitância, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias em 1 mL (UFC/mL) (CLSI, 2002; PETRIKKOU et al., 2001).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas-teste foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo chato (CLSI, 2002). Em cada linha da placa, foram adicionados 100 µL das drogas-teste duplamente concentradas e diluídas em RPMI 1640. Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado, diluído em RPMI 1640 na proporção 1:50. Um controle fúngico foi realizado substituindo as drogas-teste por solução salina esterilizada (controle de crescimento). Um controle de esterilidade também foi realizado, colocando-se apenas o meio de cultura, sem o inóculo. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelo DMSO utilizado na preparação das soluções, foi feito um controle com DMSO na concentração 0,5%, usada para a solubilização das drogas acrescido do inóculo e do meio de cultura. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por até 7 dias para a realização da leitura. Os valores de CIM foram determinados pela análise visual da inibição do crescimento em cada cavidade. A CIM é definida como a menor concentração das drogas-teste capaz de inibir 100% o crescimento fúngico observado nas cavidades.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde muitos anos o aumento na incidência de doenças fúngicas por produção de micotoxinas e formação de radicais livres afeta diretamente sua produção. (OLIVEIRA e FUENTEFRÍA, 2015). Dessa forma, alternativas naturais e seguras do ponto de vista sanitário e ambiental, como aditivos alimentares, além de substituírem os aditivos sintéticos, entram na dimensão da sustentabilidade, onde destacam-se os terpenos (PERRICONE et al., 2015; GUERRA et al., 2017; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

Com objetivo de determinar o potencial antifúngico de $\alpha(-)$ -bisabolol, os testes foram realizados para obter a relação de suas concentrações capazes de exercer o efeito protetor inibitório, onde uma certa quantidade seria suficiente para impedir o crescimento fúngico. Os valores da CIM para o $\alpha(-)$ -bisabolol frente as cepas de *F. oxysporum* estão expostos na Tabela 1. $\alpha(-)$ -bisabolol conseguiu inibir o crescimento das cepas testadas nas concentrações que variaram de 128 a 1024 $\mu\text{g/mL}$.

As cepas *F. oxysporum* 132, 134, 136 e 141 se mostraram mais sensíveis, uma vez que tiveram seu crescimento inibido quando exposta a 128 $\mu\text{g/mL}$ de $\alpha(-)$ -bisabolol, enquanto todas as demais cepas apresentaram inibição de crescimento quando expostas a concentrações maiores do mesmo. Em relação ao controle (ausência de droga), houve crescimento de *F. oxysporum* em todas as cepas. O DMSO não impediu o crescimento fúngico na concentração testada.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) de $\alpha(-)$ -bisabolol frente a cepas de *Fusarium oxysporum*.

CEPAS	$\alpha(-)$ -bisabolol ($\mu\text{G/ML}$)*
<i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> 73	256
<i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> 105	1024
<i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> 132	128
<i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> 134	128
<i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> 136	128
<i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> 141	128

*Média geométrica de três experimentos

De acordo com Perricone et al., (2015), ensaios feitos com produtos naturais podem se apresentar bastante eficientes no controle de fungos, onde a determinação da CIM se torna necessária para avaliar quantidades mínimas que controlem os mesmos. Na CIM, os produtos naturais causam suficiente estresse na célula do fungo, inibindo seu crescimento. Relata-se

também que moléculas lipofílicas como terpenos podem facilmente penetrar a célula fúngica, alterando a funcionalidade da membrana plasmática.

Em estudos realizados anteriormente, presentes na literatura, há relatos da atividade de $\alpha(-)$ -bisabolol contra outros microrganismos, onde o mesmo apresentou uma promissora atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e *Candida albicans*, embora tenha exibido menor atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (DUKE, 2002; VAN ZYL, 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da realização da pesquisa, podemos concluir que a prevalência de algumas espécies de pragas, a exemplo dos fungos, podem ser considerados fortes causadores de doenças de origem alimentar, causando fortes prejuízos a população que diariamente necessita do consumo de diversos alimentos para sobrevivência. Desta forma, visto a necessidade da utilização de produtos que viessem a proteger os alimentos contra os fungos, conservantes químicos sintéticos começaram a ser utilizados para esta finalidade, porém, frente a percepção negativa que estes produtos carregam, devido seu potencial carcinogênico e teratogênico, novas pesquisas com produtos que viessem a realizar o mesmo efeito protetor ao alimento sem causar danos a saúde dos consumidores passaram a ser bem vistos.

A utilização de produtos naturais, como os óleos essenciais e seus componentes, a exemplo dos terpenos, tornaram-se fontes de novos estudos, onde apresentam excelente potencial antifúngico. A partir da técnica de determinação da concentração inibitória mínima, observamos o potencial do $\alpha(-)$ -bisabolol para inibição do *Fusarium oxysporum*, onde em baixas concentrações, conseguiu inibir 100% do crescimento fúngico, tornando-se um excelente método para a conservação de alimentos, sem a necessidade da utilização de conservantes químicos sintéticos.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H., KHOSRAVI, A. R. & ABBASZADEH, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 2, p. e51-e56, 2014.

BRAZ FILHO, R. Phytochemical contribution to development of a emergent country. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

CHERRAT, L.; ESPINA, L.; BAKKALI, M.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. & LAGLAOUI, A. Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1197-1204, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. **Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, United States of America**, v. 22, n. 16, 2002.

DOMENICO, A. S. D.; CHRIST, D.; HASHIMOTO, E. H.; BUSO, C.; COELHO, S. R. M. Evaluation of quality attributes and the incidence of *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp. in different types of maize storage. **Journal of Stored Products Research**. v. 61, p. 59-64, 2015.

DUKE, J. A. Handbook of medicinal herbs. **CRC press**, 2002.

ENGELKIRK, P. G.; DUBEN-ENGELKIRK, J. Burton, microbiologia para ciências da saúde. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 388, 2012.

ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MAYNES, L. In vivotoxicity studies of *Fusarium* mycotoxins in the last decade: A review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 78, p. 185–206, 2015.

GORDON, T. G.; SWETT, C. L.; WINGFIELD, M. J. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. **Crop Protection**, n. 73, p. 28-39, 2015.

GRENIER, B. & APPLGATE, T. J. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. **Toxins**, v. 5, n. 2, p. 396-430, 2013.

GUERRA, F. Q.; ARAÚJO, R. S.; SOUSA, J. P.; SILVA, V. A.; PEREIRA, F. O.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. & LIMA, E. O. A new coumarin derivative, 4-acetatecoumarin, with antifungal activity and association study against *Aspergillus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2017.

JIMTHA, J. C.; JISHMA, P.; ARATHY, G. B.; ANISHA, C. & RADHAKRISHNAN, E. K. Identification of plant growth promoting Rhizosphere *Bacillus* sp. WG4 antagonistic to *Pythium myriotylum* and its enhanced antifungal effect in association with *Trichoderma*. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 16, n. 3, p. 578-590, 2016.

KAMATOU, G. P. P; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-rich oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; APARNATHI, K. D. & PRAJAPATI, J. B. Essential oils of herbs and spices: Their antimicrobial activity and application in preservation of food. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 885-901, 2016.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; APARNATHI, K. D. & PRAJAPATI, J. B. Essential oils of herbs and spices: Their antimicrobial activity and application in preservation of food. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 885-901, 2016.

OLIVEIRA, L. F. S., & FUENTEFRIA, A. M. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015.

OLIVEIRA, L. G. D.; CAVALCANTI, M. A. D. Q.; PASSAVANTE, J. Z. D. O.; FERNANDES, M. J. D. S. & LIMA, D. M. D. M. Filamentous fungi isolated from Candeias Beach, Pernambuco, Brazil. **Hoehnea**, v. 38, n. 2, 2011.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B. D. & CAJAZEIRA, J. P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

PERRICONE, M.; ARACE, E.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. & BEVILACQUA, A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 76, 2015.

PETRIKKOU, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GÓMEZ, A.; MOLLEJA, A.; MELLADO, E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. **J Clin Microbiol.** n. 39, v. 4, p. 1345-7, 2001.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; DE MELO, N. R. & SANCHES-SILVA, A. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. **Trends in food science & technology**, v. 61, p. 132-140, 2017.

SANTOS D. Y. A. C.; SANTOS, D. Y. A. C. Botânica aplicada: metabólicos secundários na interação planta-ambiente, Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**. p. 2, 2015.

VAN ZYL, R. L.; SEATLHOLO, S. T.; VAN VUUREN, S. F. & VILJOEN, A. M. The Biological Activities of 20 Nature Identical Essential Oil Constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, 2006.

VILLEGAS-RASCON, R. E.; LÓPEZ-MENESES, A. K.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; COTA-ARRIOLA, O.; MORENO-IBARRA, G. M.; CASTILLÓN-CAMPAÑA, L. G. & CORTEZ-ROCHA, M. O. Control of mycotoxigenic fungi with microcapsules of essential oils encapsulated in chitosan. **Food Sci. Technol, Campinas**, 2017.